

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591252

研究課題名(和文) 接触アレルギーにおける角化細胞接着分子と皮膚ランゲルハンス細胞の経時的解析

研究課題名(英文) Interaction of adhesion molecules of keratinocytes and Langerhans cells in the epidermis in contact hypersensitivity

研究代表者

西部 明子(NISHIBU, Akiko)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30336458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：抗原提示細胞である皮膚ランゲルハンス細胞と角化細胞接着分子の表皮内での細胞動態を明らかにするために、遺伝子改変マウスを作製し生体でのイメージングを行った。定常状態では、ランゲルハンス細胞と接した角化細胞のデスモグレインの発現は減弱・消失していた。接触皮膚炎モデルでは、ランゲルハンス細胞の数%に表皮内での遊走運動が観察され、周囲の角化細胞は柔軟に変形した。細胞遊走時にランゲルハンス細胞と接触した部位のデスモグレインの発現は低下し、遊走後は数分以内に速やかに回復した。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify cell kinetics of Langerhans cells (LC) and adhesion molecules of keratinocytes (KC) in the epidermis, in vivo imaging was performed using the genetically engineered mouse produced by crossing the desmoglein 3-EGFP mouse and the CD11c-EYFP mouse. In the stationary state, LC remained in the same position and an expression of desmoglein of KC in contact with LC had decreased or disappeared. In contact hypersensitivity induced by hapten application, an extension and retraction motion of dendrites of approximately 30% LC was enhanced, and 1 to 8 % of LC moved in an amoeboid motion in the epidermis. At the time of LC migration, the surrounding KC were changing the shape flexibly and the expression of desmoglein decreased along with the LC movement and recovered the expression promptly within several minutes after the LC migration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：角化細胞 ランゲルハンス細胞

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞は上皮に存在し、抗原を捕食すると強い抗原提示能を示す。皮膚にはランゲルハンス細胞、真皮樹状細胞があり、接触皮膚炎を始めとする皮膚の免疫応答に重要な役割を担っている。近年、接触アレルギーにおいて、抗原を捕食しリンパ節での抗原提示に関与するのは真皮樹状細胞であり、表皮ランゲルハンス細胞はむしろ抑制性に働いていることが示唆されているが、詳細は不明である。一方、表皮角化細胞は抗原や異物の刺激により種々のサイトカインやケモカインを放出し免疫応答に関与している。

角化細胞間にはデスモゾーム、アドヘレンスジャンクション、タイトジャンクションなどの接着構造により強固に結合している。一方、ランゲルハンス細胞は E-カドヘリンを介して角化細胞と接着しており、活性化時には E-カドヘリンの発現が低下し遊走することが知られているが、細胞遊走時の角化細胞やランゲルハンス細胞の動態については依然明らかになっていない。

2. 研究の目的

外界の異物や抗原と直接接触する主たる細胞は、角化細胞と表皮ランゲルハンス細胞である。抗原を捕食し活性化したランゲルハンス細胞は強固に結合した角化細胞間を遊走しなければならず、その詳細は不明である。接触アレルギーの機序を理解するためには、隣接する両者の相関を明らかにすることは重要である。われわれは角化細胞の主たる接着分子であるデスモゾームに着目し、角化細胞・デスモゾームとランゲルハンス細胞の経時的形態変化および動態変化を検討することにより、接触アレルギーの機序解明に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 角化細胞デスモゾームとランゲルハンス

細胞を可視化するために、2種類の遺伝子改変マウス(デスモグレイン(Dsg)3-EGFPマウス、CD11c-EYFPマウス)を交配し、Dsg3^{gfp}/CD11c^{yfp}マウスを作製した。Dsg3^{gfp}/CD11c^{yfp}マウス、Dsg3^{gfp}マウス、CD11c^{yfp}マウス、野生型マウス(C57BL/6J)では、肉眼的形態や成長に差異は見られなかった。

- (2) Dsg3^{gfp}/CD11c^{yfp}マウスを用い、生体での角化細胞およびランゲルハンス細胞の形態および動態変化を共焦点顕微鏡(LSM710, ZEISS)を用いてペントバルビタール麻酔下で経時的に観察した。種々の免疫染色を行った。
- (3) Dsg3^{gfp}/CD11c^{yfp}マウスをハプテンである dinitrofluorobenzene (DNFB) で感作・惹起し、接触皮膚炎モデルとした。
- (4) 画像解析には、ZEN(ZEISS)、MetaMorph(Molecular Devices)、ImageJ(NIH)ソフトウェアを用いた。

4. 研究成果

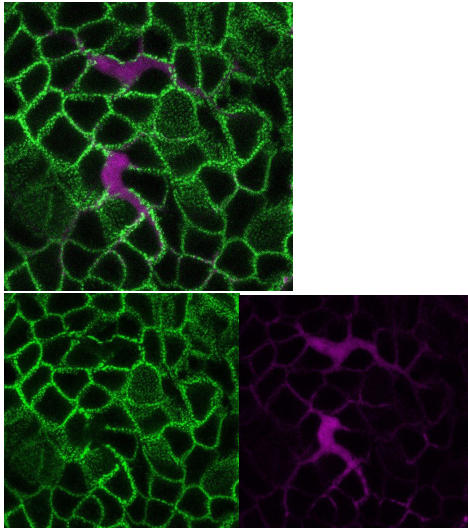
- (1) Dsg3^{gfp}/CD11c^{yfp}マウスの皮膚の免疫染色では、表皮内 CD11c-YFP 細胞はすべて Langerin 陽性、IA/IE (MHC) 陽性であり、ランゲルハンス細胞であった。また表皮内 CD11c-YFP 細胞と一致した部位では、E-cadherin および p120 カテニンは陽性であり、Dsg3-GFP の発現は減弱していた。さらに、Thy-1 陽性細胞($\gamma\delta$ T 細胞)と一致した部位での Dsg3-GFP の発現も減弱していた。

(2) *In vivo* 経時的イメージング

無刺激の定常状態では、ランゲルハンス細胞は表皮内でほぼ定位置にとどまったままで遊走運動しなかった(最長連続 6 時間観察)。また、定常状態での樹状突起の伸長・短縮運動は軽微であった。一方、角化細胞のデスモグレインの発現は、ランゲルハンス細胞の細胞体

および樹状突起と接する部位に一致して減弱あるいは消失していた。

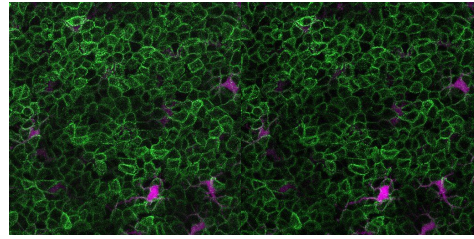
<定常状態>



Dsg3: green, CD11c: magenda

ハプテン (DNFB) 塗布により誘された接触皮膚炎モデルでは、感作相・惹起相の両相で、DNFB 塗布数時間後から、約 30%のランゲルハンス細胞に樹状突起の伸長・短縮運動の増強が観察された。またランゲルハンス細胞の表皮内遊走は、感作相・惹起相の両相で DNFB 塗布 2-6 時間後に 0.5-2%の細胞にみられ、遊走速度は $4.5 \pm 10.5 \mu\text{m}/\text{h}$ であった。惹起相ではさらに 15-30 時間後に 1-8%の細胞に表皮内遊走が認められ、遊走速度は $20.3 \pm 27.6 \mu\text{m}/\text{h}$ であり、惹起相での遊走運動が顕著に亢進していた。遊走時にはランゲルハンス細胞は樹状突起を短縮しアメーバ様に動き、移動速度は一定しておらず移動方向は不規則であった。(ランゲルハンス細胞の不規則な動きは、周囲の $\gamma\delta\text{T}$ 細胞との接触が示唆されるが、本研究では確認できていない。)一方角化細胞は、ランゲルハンス細胞の遊走の動きに応じて柔軟に変形し、変形と同時にデスマグレインの発現も急激に減弱した。この減弱は遊走後数分から数十分以内に速やかに回復した。

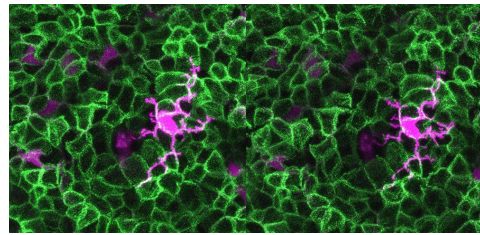
<定常状態>



0 & 90 min

角化細胞、ランゲルハンス細胞とも定位置のままで、形態変化は見られなかった。

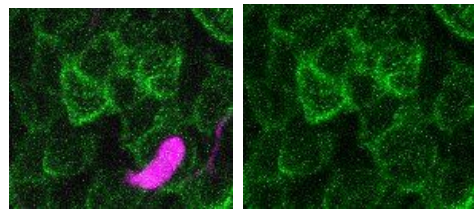
<感作相 24h 後>



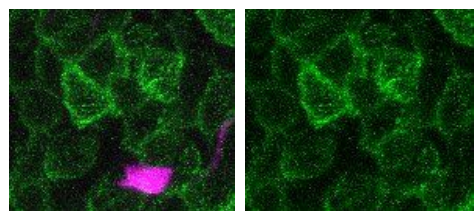
0 & 40 min

ランゲルハンス細胞および角化細胞の形態変化はごく軽微で、樹状突起は伸縮運動を呈した。

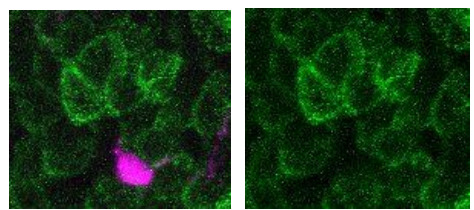
<惹起相 24h 後>



0min



10min



25min

ランゲルハンス細胞遊走時には同部位の角化細胞は変形しデスマグレインの

発現は低下した。移動後速やかに回復した。

以上をまとめると、ランゲルハンス細胞は無刺激の定常状態では定位置にとどまって遊走せず、ランゲルハンス細胞と接している角化細胞のデスモグレインの発現は低下していた。ランゲルハンス細胞は、遊走時には樹状突起を短縮して不整形になりアメーバ様に不規則に動いた。と同時に角化細胞も柔軟に変形しランゲルハンス細胞の移動に合わせてデスモグレインの発現が速やかに変化した。このことは、角化細胞間および周囲の細胞との接着は、固着したものではなく接着・分離を柔軟に行っていることを示している。このようにごく短時間に局所で見られる細胞間の接着・分離を誘導・調節する要素について、本研究期間内で明らかにするには至らなかった。今後、この調節因子の解明、ランゲルハンス細胞遊走時の角化細胞と細胞骨格の主たる成分であるアクチンの動態との関連、デスモゾームを構成する他の要素（デスモプラキン、プラコフィリン）の遊走運動時の動態についても研究をすすめる予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nakamura T, Nishibu A, Yasoshima M, Tanoue C, Yoshida N, Hatta J, Miyamoto T, Nishii M, Yanagibashi T, Nagai Y, Takatu K, Mochizuki T, Ogawa K, Analysis of Trichophyton antigen-induced contact hypersensitivity in mouse. J Dermatol Sci 2012;66:144-53. 査読有り

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

西部 明子 (NISHIBU, Akiko)

金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30336458

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

八田 稔久 (HATTA, Toshihisa)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：20238025